

Rec'd PCT/PTO 04 MAR 2005

10/526569
PCT/JP 03/11285

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

04.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 9月 6日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-261229
[ST. 10/C]: [JP2002-261229]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所

REC'D 23 OCT 2003

WIPO PCT

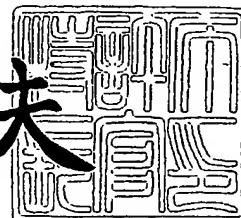
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2003年10月10日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 113MS0417

【提出日】 平成14年 9月 6日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業
技術総合研究所関西センター内

 【氏名】 近江谷 克裕

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府守口市文園町10-15 関西医科大学医化学講
座内

 【氏名】 芦高 恵美子

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府守口市文園町10-15 関西医科大学医化学講
座内

 【氏名】 伊藤 誠二

【特許出願人】

 【識別番号】 301021533

 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

 【代表者】 理事長 吉川 弘之

 【連絡先】 0727-51-9681

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 分泌型キメラタンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 分泌型ないし膜結合型生物発光タンパク質のC末端側に蛍光蛋白質を連結した、該発光タンパク質と該蛍光蛋白質の間にエネルギー移動が起こり得る分泌型キメラタンパク質。

【請求項 2】 分泌型生物発光タンパク質と蛍光蛋白質をモニターペプチドを介して連結した請求項 1 に記載の分泌型キメラタンパク質。

【請求項 3】 分泌型生物発光タンパク質がルシフェラーゼである請求項 1 または 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】 蛍光蛋白質が、GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP である請求項 1 または 2 に記載のタンパク質。

【請求項 5】 分泌型生物発光タンパク質が配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の蛋白質。

【請求項 6】 分泌型生物発光タンパク質及び蛍光蛋白質を、必要に応じてモニターペプチドを介して連結した、該発光タンパク質と該蛍光蛋白質の間にエネルギー移動が起こり得る分泌型キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項 7】 請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 8】 請求項 7 に記載のベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項 9】 請求項 8 に記載の形質転換体を培養液中で培養する工程；該培養液から分泌型キメラタンパク質を回収する工程を包含する分泌型キメラタンパク質の製造方法。

【請求項 10】 宿主細胞中の遺伝子転写活性の測定（評価）方法であって、請求項 8 に記載の形質転換体を培養し、培養液中に分泌される分泌型生物発光タンパク質の発光活性と蛍光蛋白質の蛍光活性を定量することを特徴とする方法。

【請求項 11】 細胞内における遺伝子発現を調節する薬物のスクリーニング方法であって、培養液中に薬物候補化合物を存在させて請求項 8 に記載の形質転換体を培養する工程、該候補化合物の存在下及び非存在下での培養液中に分泌され

る分泌型生物発光タンパク質の発光活性と蛍光蛋白質の蛍光活性の程度を、発光基質（ルシフェリン）の存在下に定量的に比較する工程を包含する方法。

【請求項 12】細胞内における遺伝子発現を調節する薬物が、タンパク質の修飾を調節する酵素の遺伝子転写発現調節ないし酵素活性を調節する薬物である請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】形質転換体が、配列番号 1 に示されるポリヌクレオチド配列を含む、請求項 11 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明に属する技術分野】

本発明は、分泌型キメラタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、細胞の遺伝子転写活性の測定（評価）方法並びに遺伝子発現を調節する薬物のスクリーニング方法に関する。本発明は、タンパク質の修飾を調節する酵素の遺伝子転写発現調節や酵素活性を調節する薬剤のスクリーニング方法も包含する。

【0002】

本発明のキメラタンパク質は、発光・蛍光及びエネルギー移動特性を利用することができる。

【0003】

【従来の技術】

発光酵素と蛍光蛋白質の間に起こるエネルギー移動の現象は、発光クラゲや発光シイタケの中で起こる自然現象であり、そのメカニズムは分子レベルで解明され（非特許文献 1 など）、さらにこの自然現象を模倣したRenillaルシフェラーゼ及びグリーン蛍光蛋白質融合遺伝子が構築され、ルシフェラーゼ活性及び蛍光活性を用いて遺伝子発現を定量的且つ定性的にモニターする方法が発明されている（特許文献 1 及び特許文献 2）。

【0004】

RenillaルシフェラーゼはRenilla reniformisから精製された酵素である。この酵素は、酵素の存在下で発光基質セレンテラジンの酸化的脱炭酸を触媒して、478nmの極大発光波長を伴う青色光を生成する。しかし自然界ではRenilla renif

ormis中に存在するグリーン蛍光蛋白質へのエネルギー転移に起因した510nmの極大波長を有する緑色へと偏移する。Renillaルシフェラーゼの遺伝子は既にクローン化され、そしてcDNAは遺伝子の転写活性を測定するレポータ遺伝子として有用であることが示されている。

【0005】

蛍光蛋白質は発光クラゲ、発光ウミシイタケ等の発光酵素の共在する場合と、サボテンのように単独に存在する場合がある。発光クラゲAequorea victoriaから精製されたグリーン蛍光蛋白質は発光蛋白質より青色の光を受け、これを緑色の光に変換する。この遺伝子はクローン化され、そのcDNAは細胞内で発現すると補因子を必要とせず青色励起光によって緑色の蛍光を発するので、種々の生物系（細菌、真菌、および哺乳類動物組織等）で強力なレポータ遺伝子である。野生型グリーン蛍光蛋白質改変体では、明るい発光を伴う赤方偏移の改変体や、哺乳類細胞の安定性を特化したものがある。また、天然サンゴより赤色蛍光蛋白質cDNAがクローン化され、これは同じくレポータ遺伝子として有用である。

【0006】

従来発明されたRenillaルシフェラーゼ及びグリーン蛍光蛋白質融合遺伝子構築物の細胞内での局在はRenillaルシフェラーゼの特性に依存し細胞質内全般に存在、局在することはない。また、Renillaルシフェラーゼの発光基質は細胞透過性がなく、細胞を一度、溶解させなければ、細胞内の遺伝子発現を検出できない。

【0007】

発光性甲殻類ウミボタルVargula hilgendorffiiやその近縁種Cypridina noctilucaは分泌性の発光酵素を持ち、既にウミボタル発光酵素のcDNAはクローン化されている。ウミボタル発光基質Cypridinalルシフェリンと反応して最大発光波長460nmの青色の光を発する。クローン化されたcDNAはレポータ遺伝子として、発光酵素が細胞外に分泌されることから細胞を破壊することなく遺伝子転写活性が測定できる。また、この分泌型発光酵素を画像解析することで細胞からの蛋白質の分泌を可視化することができる。一方、青色発光するが、エネルギー移動のドナー蛋白質として実用化された例はない。

【0008】

【特許文献1】

米国特許第5976796号明細書

【0009】

【特許文献2】

特表2001-501100号公報

【0010】

【非特許文献1】

Ohmiya, Y. and Hirano, T.:Shining the light: the mechanism of the bioluminescence reaction of calcium-binding photoproteins. (1996) Chemistry & Biology, 3, 337-347

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、分泌型発光酵素と蛍光蛋白質融合物を構築し、細胞外で測定可能な発光活性と蛍光活性の2機能をもつ構築物の作成及び利用を目的とする。細胞外で遺伝子転写活性を発光活性として測定、併せて細胞内から細胞外への分泌経路等を蛍光活性によって可視化できる。また、分泌型発光酵素と蛍光蛋白質の間にモニターペプチドを挿入、エネルギー移動の変化を指標としてペプチド3次元構造情報を得ることができる。この際、発光酵素の放つ発光が蛍光蛋白質を励起し、エネルギー移動により発光色が変化することで、励起光を用いずに蛍光測定可能な融合構築物を作成することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、分泌型発光酵素と蛍光蛋白質を融合化した遺伝子を構築、本発明を完成するに至った。

本遺伝子では既に遺伝子データベース上に記載されるタンパクを融合化することで得られたが、この組合せは未知であり、後述するように、融合構築物を発現解析し、分泌特性、発光特性、及び蛍光特性の3つの特性が備わっていることは本発明者が初めて明らかにした。また、本来生物界に存在しない分泌型発光酵素

(ウミボタルルシフェラーゼ)と蛍光蛋白質(YFP)の組合せでも、エネルギー移動が起きることを明らかにしたのは、本発明者が初めてである。

項1. 分泌型ないし膜結合型生物発光タンパク質のC末端側に蛍光蛋白質を連結した、該発光タンパク質と該蛍光蛋白質の間にエネルギー移動が起こり得る分泌型キメラタンパク質。

項2. 分泌型生物発光タンパク質と蛍光蛋白質をモニターペプチドを介して連結した項1に記載の分泌型キメラタンパク質。

項3. 分泌型生物発光タンパク質がルシフェラーゼである項1または2に記載のタンパク質。

項4. 蛍光蛋白質が、GFP, YFP, BFP, CFP、DsRED、RFPである項1または2に記載のタンパク質。

項5. 分泌型生物発光タンパク質が配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する、項1～4のいずれかに記載の蛋白質。

項6. 分泌型生物発光タンパク質及び蛍光蛋白質を、必要に応じてモニターペプチドを介して連結した、該発光タンパク質と該蛍光蛋白質の間にエネルギー移動が起こり得る分泌型キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

項7. 項6に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

項8. 項7に記載のベクターによって形質転換された形質転換体。

項9. 項8に記載の形質転換体を培養液中で培養する工程；該培養液から分泌型キメラタンパク質を回収する工程を包含する分泌型キメラタンパク質の製造方法。

項10. 宿主細胞中の遺伝子転写活性の測定(評価)方法であって、項8に記載の形質転換体を培養し、培養液中に分泌される分泌型生物発光タンパク質の発光活性と蛍光蛋白質の蛍光活性を定量することを特徴とする方法。

項11. 細胞内における遺伝子発現を調節する薬物のスクリーニング方法であって、培養液中に薬物候補化合物を存在させて項8に記載の形質転換体を培養する工程、該候補化合物の存在下及び非存在下での培養液中に分泌される分泌型生物発光タンパク質の発光活性と蛍光蛋白質の蛍光活性の程度を、発光基質(ルシ

フェリン) の存在下に定量的に比較する工程を包含する方法。

項 1 2. 細胞内における遺伝子発現を調節する薬物が、タンパク質の修飾を調節する酵素の遺伝子転写発現調節ないし酵素活性を調節する薬物である項 1 1 に記載の方法。

項 1 3. 形質転換体が、配列番号 1 に示されるポリヌクレオチド配列を含む、項 1 1 に記載の方法。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を説明する。

【0014】

本発明のキメラタンパク質は、分子内のエネルギー移動が可能である特徴を有する。分子内のエネルギー移動とは、生物発光タンパク質から放出される光エネルギーを蛍光蛋白質で受け取り蛍光を発することを意味し、外部から光を与えなくても蛍光を発する点に特徴を有する。生物発光タンパク質は、蛍光蛋白質の励起波長の光を放出するものであり、本発明のキメラタンパク質はこのような生物発光タンパク質／蛍光蛋白質の組み合わせを有する。また、該キメラタンパク質は分泌性であり、細胞外にルシフェリンを与えることによりその存在を蛍光により容易に検出可能である。

【0015】

GFP のような蛍光蛋白質のみでは、蛍光による定性分析は可能であるが、外部からの励起光により蛍光を発するため定量することはできない。一方、本発明のキメラタンパク質では生物発光タンパク質からの励起光により蛍光蛋白質から蛍光を発するので、キメラタンパク質の各修飾体（モニターペプチドにおける切断、糖鎖による修飾等）をその蛍光波長のシフトに基づき各々定量することが可能である。

【0016】

本発明において、モニタータンパク質は、生物発光タンパク質から蛍光蛋白質への光エネルギーの移動を妨げないものであれば特に限定されない。モニターペプチドのアミノ酸の数は、通常 5 ～ 100 個、好ましくは 6 ～ 50 個、より好ま

しくは6～20個、特に6～15個である。該モニターペプチドに制限酵素部位を導入すれば、キメラタンパク質の製造がより容易になる。該モニターペプチドに特定のプロテアーゼに対する蛋白加水分解部位を導入すると、分泌過程における蛋白加水分解酵素の働きを定量することができ、各種分泌タンパク質のプロセッシング酵素の機能に影響する物質を定量的にスクリーニングすることが可能になる。好ましいモニターペプチド配列の1つは、配列番号4に示される40個のアミノ酸からなる配列である。

【0017】

本発明の好ましい実施形態の1つにおいて、モニターペプチド配列は、親水性で、 α ヘリックス構造を取るのがエネルギー移動効率を高める上で有利であることが考えられる。

【0018】

本明細書において、生物発光タンパク質としては、ウミボタルなどのホタル、発光昆虫（ヒカリコメツキなど）、発光ミミズ、ラチア、ウミシイタケ、オワンクラゲなどの各種発光生物由来のルシフェラーゼが例示される。例えば、ウミボタル・ルシフェラーゼは分泌型であるのでそのまま分泌型生物発光タンパク質として利用でき、ウミシイタケ由来のルシフェラーゼのように非分泌型ルシフェラーゼの場合には、N末端側に分泌タンパク質を導入し、分泌型生物発光タンパク質として利用することもできる。

【0019】

蛍光蛋白質としては、グリーン蛍光蛋白質（GFP）、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP、エクオリンなどが例示される。

【0020】

本発明の蛍光蛋白質は、生物発光タンパク質から放出される光が蛍光蛋白質の励起波長になるように選択される。このような組み合わせとしては、例えば以下のものが挙げられる。

【0021】

【表1】

| 生物発光タンパク質 | 蛍光蛋白質 |
|-----------------|----------------------------|
| ウミボタル・ルシフェラーゼ | GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP、 |
| ホタル・ルシフェラーゼ | DsRED |
| 発光性渦鞭毛藻・ルシフェラーゼ | GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP |
| ヒカリコメツキ・ルシフェラーゼ | DsRED |
| ウミシイタケ・ルシフェラーゼ | GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP |
| エクオリン | GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP、 |

【0022】

分泌型生物発光タンパク質と蛍光蛋白質は、直接連結させてもよく、両者の間にモニターペプチド配列を介在させて連結してもよい。

【0023】

本発明のキメラタンパクには、以下の1)－3)に示す蛋白質が包含される。

1) 分泌型生物発光タンパク質のC末端側に蛍光蛋白質を連結した分泌型キメラタンパク質。該タンパク質の好ましい実施形態の1つが、配列番号1記載のアミノ酸配列によって表わされるタンパク質である。

2) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列より表わされ、且つ分泌性、発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有する融合構築物である。

2) のタンパクは、1) のタンパクに分泌性、発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を失わない程度の変異が導入されたタンパクである。このような変異は、自然界において生じる（例えば対立遺伝子）ほかに、人為的な変異も含む。人為的な変異を生じさせる手段としては、部位特異的な変異誘導法（Nucleic Acids Res. 10, 6487-6500, 1982）などを挙げることができるが、これに限定されるわけではない。変異したアミノ酸の数は、分泌、発光、蛍光活性及びエネルギー移動特性が失われない限り、その個数は制限されないが、好ましくは発光酵素及び蛍光蛋白質部分において20アミノ酸以内であり、より好ましくは15アミノ酸以内であり、更に好ましくは10アミノ酸以内であり、最も好ましくは5

アミノ酸以内である。また、発光酵素及び蛍光蛋白質を連結するモニターペプチドは、1～100個のアミノ酸について、任意に置換、欠失、付加、挿入することができる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入により変異を導入する場合には、変異を導入したタンパクが発光・蛍光活性を維持しているかは、そのタンパクの発光・蛍光活性を調べることによって判定できる。

【0024】

本発明のポリヌクレオチドには、分泌型生物発光タンパク質のC末端側に蛍光蛋白質を連結した分泌型キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。該ポリヌクレオチドの好ましい実施形態の1つとして、配列番号1または2記載の塩基配列により表わされるDNA又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAが挙げられ、該DNAがコードするタンパクは、分泌活性、発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有する融合構築物である。

【0025】

上記のDNAがコードするタンパクは、DNA同士のハイブリダイゼーションを利用することにより得られる分泌型発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有する蛋白質である。本明細書において「ストリンジェントな条件」とは、特異的なハイブリダイゼーションのみが起き、非特異的なハイブリダイゼーションが起きないような条件をいう。このような条件は、通常、「1xSSC, 0.1%SDS, 37℃」程度であり、好ましくは「0.5xSSC, 0.1%SDS, 42℃」程度であり、更に好ましくは「0.2xSSC, 0.1%SDS, 65℃」程度である。ハイブリダイゼーションによって得られるDNAは配列番号1または2記載の塩基配列により表わされるDNAと通常高い相同性を有する。高い相同性とは、60%以上の相同性、好ましくは75%以上の相同性、更に好ましくは90%以上の相同性、特に95%以上の相同性を指す。

【0026】

本発明のタンパクは、後述する本発明の遺伝子を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞内で発現させることにより得ることができる。発現ベクターとして、例えば、pBT-VL-mp-YFP (VLはウミボタル・ルシフェラーゼ、mpはモニター

ペプチド、YFPは黄色蛍光蛋白質をそれぞれ示す) などを用いることができ、宿主細胞としては哺乳動物細胞、酵母などの真核生物細胞、大腸菌、枯草菌、藻類、真菌類などの原核生物細胞が挙げられ、そのいずれを用いてもよい。好ましい宿主細胞としては、哺乳動物培養細胞COS7細胞株(この系では哺乳類系のタンパク合成、タンパク修飾過程を経ることが重要であり、つまり、この過程をモニタリングする) などを用いることができる。

【0027】

本発明の好ましいキメラタンパク質をコードする遺伝子(ポリヌクレオチド)は、

- 1) 配列番号1記載の塩基配列を有する遺伝子。
- 2) 配列番号1記載の塩基配列により表わされるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有する遺伝子である。

(スクリーニング方法)

本発明のキメラタンパク質をコードする遺伝子を組み込んだ形質転換体を培養することにより、宿主細胞中の遺伝子転写活性を測定(評価)することができ、また、細胞内における遺伝子発現を調節する薬物をスクリーニングすることができる。

【0028】

本発明のキメラタンパク質は、細胞内に導入し、蛍光強度及び波長のシフトを追跡することで、細胞内において、mRNAからのタンパク合成の速度、合成されたタンパク質のフォールディングやプロセッシング、タンパク質の膜結合ないし分泌の機構などが正常に働いているかどうかを検証することができる。

【0029】

従って、本発明のキメラタンパク質を発現可能な形質転換体を、薬物の候補化合物の存在下に培養した場合と、非存在下に培養した場合の結果を比較することにより、当該候補化合物がタンパク発現系にどのような作用を及ぼすかが分かり、タンパク発現系(遺伝子発現系)に作用する候補化合物を選択することが可能である。

【0030】

比較対象としては、融合タンパク質の発現の総量、細胞内と細胞外における融合タンパク質の発現量の比較、融合タンパク質の蛍光蛋白質に対応する蛍光波長のシフトの程度、モニターペプチドの切断・糖鎖結合の程度などが挙げられる。

【0031】

例えば、糖尿病患者の中には、プロインシュリンからインシュリンへのプロセッシングの異常、つまり切断部位のアミノ酸残基の変異やタンパク質限定分解酵素の活性低下に伴い活性型のインシュリンを合成出来ない場合がある。このようなプロセッシングの異常を正常にする薬物は、糖尿病治療薬として有用である。

【0032】

また、プロオピオメラノコルチコトロピン (POMC) は、共通の前駆物質とするペプチドホルモンとして、ACTH, β リポトロピン (β LPH), α および β メラニン細胞刺激ホルモン (MSH), エンケファリンとエンドルフィンがあり、POMCから活性ペプチドへの切断過程に影響を与えることで、ACTHの切り出しを指標とした抗炎症剤やエンドルフィンの切り出しを指標とした鎮痛剤のスクリーニング系としても使用可能である。

【0033】

本発明のキメラタンパク質は細胞外に分泌されるため、培養液中に発光基質 (ルシフェリン) を加えて生物発光タンパク質と蛍光蛋白質を各々独立して定量することができる。蛍光蛋白質の切断、モニターペプチドの切断や糖鎖修飾などにより生物発光タンパク質と蛍光蛋白質の発光の程度は大きく影響されるため、本発明のスクリーニング系により、薬物候補化合物がどの程度遺伝子発現系に影響を与えたのかを定量的に評価できる。

【0034】

本発明のキメラタンパク質は細胞外に分泌されるため、細胞を破壊することなく、培養液中に発光基質 (ルシフェリン) を加えることで発光スペクトルや発光活性を測定することができ、生物発光タンパク質と蛍光蛋白質の間に起きているエネルギー移動を定量化できる。分泌された融合タンパク質は細胞内で生理的な分泌過程を経て、多くの修飾を受けている。モニターペプチドの切断や糖鎖修飾などにより生物発光タンパク質と蛍光蛋白質の間に起きるエネルギー移動は顕著

に変化、発光スペクトルの形状が変化する。本発明のスクリーニング系により、例えばモニターペプチドの切断に伴って、エネルギー移動は消失、或いは糖鎖修飾によりエネルギー移動が増減するため、薬物候補化合物がどの程度、切断や糖鎖修飾を行うタンパク質修飾酵素の酵素活性やその遺伝子発現に影響を与えたのか、を定量的に評価できる。

【0035】

【実施例】

以下、本発明を、実施例を挙げてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されることはない。

【0036】

実施例 1

ウミボタル発光酵素(Vargula Luciferase;;以下、「VL」または「Vluc」と略すことがある)遺伝子(Thompson, E. M., Nagata, S. & Tsuji, F. I. Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod Vargula hilgendorffii. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 6567-71 (1989).)及び発光クラゲ由来変異型黄色蛍光蛋白質(EYFP)遺伝子のフラグメントをポリメラーゼ連鎖反応(以下PCR法)によって増幅、哺乳類細胞発現用ベクターに挿入、発光・蛍光融合蛋白質遺伝子を構築した。図1は、ベクターのマップと、遺伝子部分の配列を記したものである。Vlucを増幅する際、プライマー1(5'-(HindIII-BstXI) CACAAGCTTCCATTGTGCTGGATGAAGATAATAATTCTGTCTGT TATATTGGC-3'; プライマー2(5'-(BamHI) TGTGGATCCCTTGACATTCAGGTGG TACTTCTAG-3'))とし、VlucのN末端に開始コドンを、C末端には終止コドンを削除、BamHIサイトを含むリンカー配列を導入した。一方、EYFPの増幅はプライマー3(5'-(HindIII-NotI-BamHI) CAAGCTTGGCGCCGCGAGGATCCGTGAGCAAGGGCGA GGAGCTGTTTAC-3')、プライマー4(5'-(BstXI) TACCATTGTGCTGGATGG TGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3')とし、EYFPのN末端に開始コドンを削除、BamHIサイトを含むリンカー配列を、C末端には終止コドンを導入した。哺乳類細胞発現用ベクターとして既に公知であるpE-BOS(S Mizushima & S Nagata pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. Nucleic Acids Research, Vol.18, No.17 P.5322)のBstXIに順次挿入して作成

、pEF-BOS Vluc-EYFPと命名した。また、本ベクターでは上流にウミボタル発光酵素遺伝子を下流に発光クラゲ由来変異型黄色蛍光蛋白質遺伝子を配しており、その中間のBamHI制限酵素部位にはペプチド配列が挿入可能である。

【 0 0 3 7 】

実施例 2

発光・蛍光融合蛋白質遺伝子pEF-BOS Vluc-EYFPをCos7細胞に導入したところ、発光・蛍光融合蛋白質Vluc-EYFPが作られたことを発光酵素Vluc抗体、蛍光蛋白質EYFP抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した。図 2 はVluc、EYFP、Vluc-EYFPをそれぞれ導入した際の細胞内、細胞外培地での結果である。細胞外にはVluc（分子量63 kDa）、EYFP（分子量27 kDa）及びVluc-EYFP（分子量95 kDa）が分泌された。Vluc-EYFPの細胞内の発現では、より小さいサイズの蛋白質も作られていたが、分泌したものは完全長のものと考えられる。融合蛋白質が分泌されることから、Cos7細胞の蛍光画像を観察した。比較として分泌シグナルを持たないウミシイタケRlucとEYFPを融合したものRluc-EYFP導入細胞も観察した。図 3 の蛍光画像によると、Rluc-EYFPの蛍光画像が細胞全体に満遍なく広がるのに対して、Vluc-EYFPでは蛍光は細胞内に局所、Vluc-EYFPタンパク質はVlucの持つ分泌シグナルに呼応して、局在、分泌されることが確認できた。分泌されたVluc-EYFPの発光活性を測定した結果、図 4 のようにVluc単独と比較して、約 8 0 %程度の発光活性が保持されていた。以上の結果、Vluc-EYFPはVlucの持つ発光活性能及び分泌能と、蛍光蛋白質の蛍光能を有する融合蛋白質である。また、発光活性はプロモータ活性の強さ、分泌能は分泌過程・経路の可視化能を、蛍光は、融合蛋白質の局在を指している。

【 0 0 3 8 】

実施例 3

Vluc-EYFPの発光スペクトルを測定した。図 5 で示すように 2 つの発光スペクトルのピーク（図 5 - 2））が観察され、うち一つは発光酵素単独のもの（図 5 - 1））、つまり最大発光波長460nmと一致した。また長波長側のピークは蛍光蛋白質単独の蛍光スペクトルのピーク（図 5 - 3））と一致した。また、発光・蛍光融合蛋白質遺伝子の蛍光スペクトルとも一致した。この長波長側のピークは発

光・蛍光蛋白質間のエネルギー移動による、つまり発光蛋白質の発する光が励起光となり蛍光蛋白質より長波長の光、蛍光を発したものである。このエネルギー移動は単独にVlucとEYFPを加えてもおきないことは確認した。よって、Vluc-EYFPは分泌する特性を持ち、且つ発光、蛍光特性及び発光・蛍光蛋白質間のエネルギー移動特性が保持された構築物である。

【0039】

実施例 4

発光・蛍光融合蛋白質遺伝子のリンカー配列部分BamHI制限酵素部位に2つのペプチド配列を挿入した。図6では挿入ペプチド1及び挿入ペプチド2に対する発光スペクトルを表わしたものである。挿入ペプチド1ではエネルギー移動が起き、長波長側に小さなピークがみられた。しかしながら、ペプチド配列2ではエネルギー移動が起きなかった。この結果よりエネルギー移動は挿入されたペプチド配列に依存することが明らかとなった。それぞれのペプチド配列の2次構造予測及び疎水性解析を行うとそれぞれのペプチド配列の立体的な構造が異なることが予想され（図7）、このエネルギー移動の違いを指標に挿入ペプチドの立体構造情報を得ることができることが明らかとなった。すなわち、スパーサーペプチド配列2では、疎水性が高くまた、 β シートと α ヘリックスが混在するため、発光蛋白質と蛍光蛋白質の間においてエネルギー移動を生じにくい位置関係となるのに対し、スパーサーペプチド配列1では、親水性且つ α ヘリックス構造が多いことから、エネルギー移動が起きやすい位置関係となっている。

【0040】

【発明の効果】

本発明は、モニター蛋白質及びそれをコードする遺伝子、本酵素の発現を制御する遺伝子を提供する。この融合蛋白質はウミボタル発光酵素の分泌する特性及び生物発光活性を有し、同時に蛍光蛋白質の蛍光特性を有している。ウミボタル発光酵素－蛍光融合蛋白質は酵素活性に遺伝子の発現量及び細胞からの分泌を、また蛍光から細胞内での分泌部位の位置情報を定量的にモニターするためのマルチマーカーとして利用できる。さらに発光酵素と蛍光蛋白質の間にペプチドを配することでエネルギー移動効率に変化する特性から挿入ペプチドの3次元構造や

切断や糖付加等の機能変化情報を得るセンサーとして利用できる。

【 0 0 4 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Secreted type chimera protein

<130> 113MS0417

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2388

<212> DNA

<213>

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2388)

<400> 1

atg aag ata ata att ctg tct gtt ata ttg gcc tac tgt gtc acc gac 48

Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp

1

5

10

15

aac tgt caa gat gca tgt cct gta gaa gcg gaa ccg cca tca agt aca 96

Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr

20

25

30

cca aca gtt cca act tct tgt gaa gct aaa gaa gga gaa tgt ata gat 144

Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp

35

40

45

acc aga tgc gca aca tgt aaa cga gat ata cta tca gat gga ctg tgt 192

Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys

50

55

60

gaa aat aaa cca ggg aag aca tgc tgt aga atg tgc cag tat gtg att 240

Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile

65

70

75

80

gaa tgc aga gta gaa gca gct ggt tat ttt aga acg ttt tac ggc aaa 288

Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys

85

90

95

aga ttt aat ttt cag gaa cct ggt aaa tat gtg ctg gct agg gga acc 336

Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr

100

105

110

aag ggt ggc gat tgg tct gta acc ctc acc atg gag aat cta gat gga 384

Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly

115

120

125

cag aag gga gct gtg ctg act aag aca aca ctg gag gtt gca gga gac 432

Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp

130

135

140

gta ata gac att act caa gct act gca gat cct atc aca gtt aac gga 480

Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly

145

150

155

160

gga gct gac cca gtt atc gct aac ccg ttc aca att ggt gag gtg acc 528

Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr

165

170

175

att gct gtt gtt gaa ata ccg ggc ttc aat atc aca gtc atc gaa ttc 576

Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe

180

185

190

ttt aaa cta atc gtg att gat att ctg gga gga aga tct gtg aga att 624

Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile

195

200

205

gct cca gac aca gca aac aaa gga ctg ata tct ggt atc tgt ggt aat 672

Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn

210

215

220

ctg gag atg aat gac gct gat gac ttt act aca gat gca gat cag ctg 720

Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr Asp Ala Asp Gln Leu

225

230

235

240

gcg atc caa ccc aac ata aac aaa gag ttc gac ggc tgc cca ttc tat 768

Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr

245

250

255

ggc aat cct tct gat atc gaa tac tgc aaa ggt ctg atg gag cca tac 816

Gly Asn Pro Ser Asp Ile Glu Tyr Cys Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr

260

265

270

aga gct gta tgt cgt aac aat atc aac ttc tac tat tac act cta tcc 864
Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Tyr Thr Leu Ser
275 280 285

tgt gcc ttc gct tac tgt atg gga gga gaa gaa aga gct aaa cac gtc 912
Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val
290 295 300

ctt ttc gac tat gtt gag aca tgc gct gcg ccg gaa acg aga gga acg 960
Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr
305 310 315 320

tgt gtt tta tca gga cat act ttc tat gac aca ttc gac aaa gca aga 1008
Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg
325 330 335

tat caa ttc cag ggc cca tgc aag gag att ctg atg gcc gca gac tgt 1056
Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys
340 345 350

tac tgg aac aca tgg gat gta aag gtt tca cat aga gac gtc gaa tca 1104
Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser
355 360 365

tac act gag gta gag aaa gta aca atc agg aaa cag tca act gta gta 1152
Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val
370 375 380

gat ctc att gtg gat ggc aag cag gtc aag gtt gga gga gtg gat gta 1200

Asp Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Gly Val Asp Val
 385 390 395 400

tct atc ccg tac agc tct gag aac act tcc ata tac tgg cag gat gga 1248
 Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly
 405 410 415

gac atc ctg acg acg gcc atc cta cct gaa gct ctt gtc gtt aag ttc 1296
 Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe
 420 425 430

aac ttt aag cag ctc ctt gta gtt cat atc aga gat cca ttc gat gga 1344
 Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Gly
 435 440 445

aag aca tgc ggc ata tgt ggt aac tat aat caa gat tca act gat gat 1392
 Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp
 450 455 460

ttc ttt gac gca gaa gga gca tgc gct cta acc ccc aac ccc cca gga 1440
 Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly
 465 470 475 480

tgt aca gag gaa cag aaa cca gaa gct gag cga ctt tgc aat aat ctc 1488
 Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu
 485 490 495

ttt gat tct tct atc gac gag aaa tgt aat gtc tgc tac aag cct gac 1536
 Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp

500

505

510

cgg att gcc cga tgt atg tac gag tat tgc ctg agg gga caa caa gga 1584

Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly

515

520

525

ttt tgt gac cat gct tgg gag ttc aag aaa gaa tgc tac ata aaa cat 1632

Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His

530

535

540

gga gac act cta gaa gta cca cct gaa tgt caa gga tcc gtg agc aag 1680

Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln Gly Ser Val Ser Lys

545

550

555

560

ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac 1728

Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp

565

570

575

ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc 1776

Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly

580

585

590

gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc 1824

Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly

595

600

605

aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ttc ggc tac ggc 1872

Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly

610

615

620

ctg cag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc 1920

Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe

625

630

635

640

ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc 1968

Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe

645

650

655

ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag 2016

Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu

660

665

670

ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag 2064

Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys

675

680

685

gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc 2112

Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser

690

695

700

cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg 2160

His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val

705

710

715

720

aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc 2208

Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala

725

730

735

gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg 2256
Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu
740 745 750

ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc 2304
Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
755 760 765

aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc 2352
Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
770 775 780

ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag taa 2388
Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
785 790 795

<210> 2

<211>2505

<212>

<213> chimeric protein

<400> 2

atg aag ata ata att ctg tct gtt ata ttg gcc tac tgt gtc acc gac 48
Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp
1 5 10 15

aac tgt caa gat gca tgt cct gta gaa gcg gaa ccg cca tca agt aca 96
Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr
20 25 30

cca aca gtt cca act tct tgt gaa gct aaa gaa gga gaa tgt ata gat 144
Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp

35

40

45

acc aga tgc gca aca tgt aaa cga gat ata cta tca gat gga ctg tgt 192
Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys

50

55

60

gaa aat aaa cca ggg aag aca tgc tgt aga atg tgc cag tat gtg att 240
Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile

65

70

75

80

gaa tgc aga gta gaa gca gct ggt tat ttt aga acg ttt tac ggc aaa 288
Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys

85

90

95

aga ttt aat ttt cag gaa cct ggt aaa tat gtg ctg gct agg gga acc 336
Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr

100

105

110

aag ggt ggc gat tgg tct gta acc ctc acc atg gag aat cta gat gga 384
Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly

115

120

125

cag aag gga gct gtg ctg act aag aca aca ctg gag gtt gca gga gac 432
Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp

130

135

140

gta ata gac att act caa gct act gca gat cct atc aca gtt aac gga 480

Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly

145 150 155 160

gga gct gac cca gtt atc gct aac ccg ttc aca att ggt gag gtg acc 528

Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr

165 170 175

att gct gtt gtt gaa ata ccg ggc ttc aat atc aca gtc atc gaa ttc 576

Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe

180 185 190

ttt aaa cta atc gtg att gat att ctg gga gga aga tct gtg aga att 624

Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile

195 200 205

gct cca gac aca gca aac aaa gga ctg ata tct ggt atc tgt ggt aat 672

Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn

210 215 220

ctg gag atg aat gac gct gat gac ttt act aca gat gca gat cag ctg 720

Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr Asp Ala Asp Gln Leu

225 230 235 240

gcg atc caa ccc aac ata aac aaa gag ttc gac ggc tgc cca ttc tat 768

Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr

245 250 255

ggc aat cct tct gat atc gaa tac tgc aaa ggt ctg atg gag cca tac 816

Gly Asn Pro Ser Asp Ile Glu Tyr Cys Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr
 260 265 270

aga gct gta tgt cgt aac aat atc aac ttc tac tat tac act cta tcc 864
 Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Tyr Thr Leu Ser
 275 280 285

tgt gcc ttc gct tac tgt atg gga gga gaa gaa aga gct aaa cac gtc 912
 Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val
 290 295 300

ctt ttc gac tat gtt gag aca tgc gct gcg ccg gaa acg aga gga acg 960
 Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr
 305 310 315 320

tgt gtt tta tca gga cat act ttc tat gac aca ttc gac aaa gca aga 1008
 Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg
 325 330 335

tat caa ttc cag ggc cca tgc aag gag att ctg atg gcc gca gac tgt 1056
 Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys
 340 345 350

tac tgg aac aca tgg gat gta aag gtt tca cat aga gac gtc gaa tca 1104
 Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser
 355 360 365

tac act gag gta gag aaa gta aca atc agg aaa cag tca act gta gta 1152
 Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val

370

375

380

gat ctc att gtg gat ggc aag cag gtc aag gtt gga gga gtg gat gta 1200

Asp Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Gly Val Asp Val

385

390

395

400

tct atc ccg tac agc tct gag aac act tcc ata tac tgg cag gat gga 1248

Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly

405

410

415

gac atc ctg acg acg gcc atc cta cct gaa gct ctt gtc gtt aag ttc 1296

Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe

420

425

430

aac ttt aag cag ctc ctt gta gtt cat atc aga gat cca ttc gat gga 1344

Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Gly

435

440

445

aag aca tgc ggc ata tgt ggt aac tat aat caa gat tca act gat gat 1392

Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp

450

455

460

ttc ttt gac gca gaa gga gca tgc gct cta acc ccc aac ccc cca gga 1440

Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly

465

470

475

480

tgt aca gag gaa cag aaa cca gaa gct gag cga ctt tgc aat aat ctc 1488

Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu

485

490

495

ttt gat tct tct atc gac gag aaa tgt aat gtc tgc tac aag cct gac 1536

Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp

500

505

510

cgg att gcc cga tgt atg tac gag tat tgc ctg agg gga caa caa gga 1584

Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly

515

520

525

ttt tgt gac cat gct tgg gag ttc aag aaa gaa tgc tac ata aaa cat 1632

Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His

530

535

540

gga gac act cta gaa gta cca cct gaa tgt caa gga tcc aca gag ccc 1680

Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln Gly Ser Thr Glu Pro

545

550

555

560

ggc ctg gag gag gtg ggg gag att gag cag aaa cag ctg cag aag cgg 1728

Gly Leu Glu Glu Val Gly Glu Ile Glu Gln Lys Gln Leu Gln Lys Arg

565

570

575

ttc ggg ggc ttc acc ggg gcc cgg aag tgc gcc cgg aag ttg gcc aac 1776

Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys Leu Ala Asn

580

585

590

cag gga tcc gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc 1824

Gln Gly Ser Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro

595

600

605

atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg 1872
Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val
610 615 620

tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag 1920
Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys
625 630 635

ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg 1968
Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val
640 645 650 655

acc acc ttc ggc tac ggc ctg cag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac 2016
Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His
660 665 670

atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc 2064
Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
675 680 685

cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc 2112
Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg
690 695 700

gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg 2160
Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
705 710 715

aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg 2208

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
 720 725 730 735

gag tac aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag 2256
 Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln
 740 745 750

aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac 2304
 Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
 755 760 765

ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc 2352
 Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
 770 775 780

gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc 2400
 Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser
 785 790 795

gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg 2448
 Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
 800 805 810 815

gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac 2496
 Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
 820 825 830

aag taa 2505

Lys

<210> 3

<211> 2505

<212> DNA

<213>

<400> 3

atg aag ata ata att ctg tct gtt ata ttg gcc tac tgt gtc acc gac 48
Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp
1 5 10 15

aac tgt caa gat gca tgt cct gta gaa gcg gaa ccg cca tca agt aca 96
Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr
20 25 30

cca aca gtt cca act tct tgt gaa gct aaa gaa gga gaa tgt ata gat 144
Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp
35 40 45

acc aga tgc gca aca tgt aaa cga gat ata cta tca gat gga ctg tgt 192
Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys
50 55 60

gaa aat aaa cca ggg aag aca tgc tgt aga atg tgc cag tat gtg att 240
Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile
65 70 75 80

gaa tgc aga gta gaa gca gct ggt tat ttt aga acg ttt tac ggc aaa 288
Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys

85

90

95

aga ttt aat ttt cag gaa cct ggt aaa tat gtg ctg gct agg gga acc 336

Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr

100

105

110

aag ggt ggc gat tgg tct gta acc ctc acc atg gag aat cta gat gga 384

Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly

115

120

125

cag aag gga gct gtg ctg act aag aca aca ctg gag gtt gca gga gac 432

Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp

130

135

140

gta ata gac att act caa gct act gca gat cct atc aca gtt aac gga 480

Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly

145

150

155

160

gga gct gac cca gtt atc gct aac ccg ttc aca att ggt gag gtg acc 528

Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr

165

170

175

att gct gtt gtt gaa ata ccg ggc ttc aat atc aca gtc atc gaa ttc 576

Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe

180

185

190

ttt aaa cta atc gtg att gat att ctg gga gga aga tct gtg aga att 624

Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile

195

200

205

gct cca gac aca gca aac aaa gga ctg ata tct ggt atc tgt ggt aat 672

Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn

210

215

220

ctg gag atg aat gac gct gat gac ttt act aca gat gca gat cag ctg 720

Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr Asp Ala Asp Gln Leu

225

230

235

240

gcg atc caa ccc aac ata aac aaa gag ttc gac ggc tgc cca ttc tat 768

Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr

245

250

255

ggc aat cct tct gat atc gaa tac tgc aaa ggt ctg atg gag cca tac 816

Gly Asn Pro Ser Asp Ile Glu Tyr Cys Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr

260

265

270

aga gct gta tgt cgt aac aat atc aac ttc tac tat tac act cta tcc 864

Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Tyr Thr Leu Ser

275

280

285

tgt gcc ttc gct tac tgt atg gga gga gaa gaa aga gct aaa cac gtc 912

Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val

290

295

300

ctt ttc gac tat gtt gag aca tgc gct gcg ccg gaa acg aga gga acg 960

Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr

305

310

315

320

tgt gtt tta tca gga cat act ttc tat gac aca ttc gac aaa gca aga 1008

Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg

325

330

335

tat caa ttc cag ggc cca tgc aag gag att ctg atg gcc gca gac tgt 1056

Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys

340

345

350

tac tgg aac aca tgg gat gta aag gtt tca cat aga gac gtc gaa tca 1104

Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser

355

360

365

tac act gag gta gag aaa gta aca atc agg aaa cag tca act gta gta 1152

Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val

370

375

380

gat ctc att gtg gat ggc aag cag gtc aag gtt gga gga gtg gat gta 1200

Asp Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Gly Val Asp Val

385

390

395

400

tct atc ccg tac agc tct gag aac act tcc ata tac tgg cag gat gga 1248

Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly

405

410

415

gac atc ctg acg acg gcc atc cta cct gaa gct ctt gtc gtt aag ttc 1296

Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe

420

425

430

aac ttt aag cag ctc ctt gta gtt cat atc aga gat cca ttc gat gga 1344

Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Gly
 435 440 445

aag aca tgc ggc ata tgt ggt aac tat aat caa gat tca act gat gat 1392
 Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp
 450 455 460

ttc ttt gac gca gaa gga gca tgc gct cta acc ccc aac ccc cca gga 1440
 Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly
 465 470 475 480

tgt aca gag gaa cag aaa cca gaa gct gag cga ctt tgc aat aat ctc 1488
 Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu
 485 490 495

ttt gat tct tct atc gac gag aaa tgt aat gtc tgc tac aag cct gac 1536
 Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp
 500 505 510

cgg att gcc cga tgt atg tac gag tat tgc ctg agg gga caa caa gga 1584
 Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly
 515 520 525

ttt tgt gac cat gct tgg gag ttc aag aaa gaa tgc tac ata aaa cat 1632
 Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His
 530 535 540

gga gac act cta gaa gta cca cct gaa tgt caa gga tcc ctg gtt ggc 1680
 Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln Gly Ser Leu Val Gly

545

550

555

560

caa ctt ccg ggc cga ctt ccg ggc ccc ggt gaa gcc ccc gaa ccg ctt 1728

Gln Leu Pro Gly Arg Leu Pro Gly Pro Gly Glu Ala Pro Glu Pro Leu

565

570

575

ctg cag ctg ttt ctg ctc aat ctc ccc cac ctc ctc cag gcc ggg ctc 1776

Leu Gln Leu Phe Leu Leu Asn Leu Pro His Leu Leu Gln Ala Gly Leu

580

585

590

tgt gga tcc gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc 1824

Cys Gly Ser Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro

595

600

605

atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg 1872

Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val

610

615

620

tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag 1920

Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys

625

630

635

ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg 1968

Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val

640

645

650

655

acc acc ttc ggc tac ggc ctg cag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac 2016

Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His

660

665

670

atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc 2064

Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val

675

680

685

cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc 2112

Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg

690

695

700

gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg 2160

Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu

705

710

715

aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg 2208

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu

720

725

730

735

gag tac aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag 2256

Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln

740

745

750

aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac 2304

Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp

755

760

765

ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc 2352

Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly

770

775

780

gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc 2400

Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser

785

790

795

. gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg 2448

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu

800

805

810

815

gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac 2496

Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr

820

825

830

aag taa

2505

Lys

<210> 4

<211> 40

<212> PRT

<213>

<400> 4

Gly Ser Thr Glu Pro Gly Leu Glu Glu Val Gly Glu Ile Glu Gln Lys

1

5

10

15

Gln Leu Gln Lys Arg Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala

20

25

30

Arg Lys Leu Ala Asn Gln Gly Ser

35

40

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213>

<400> 5

Gly Ser Leu Val Gly Gln Leu Pro Gly Arg Leu Pro Gly Pro Gly Glu

1

5

10

15

Ala Pro Glu Pro Leu Leu Gln Leu Phe Leu Leu Asn Leu Pro His Leu

20

25

30

Leu Gln Ala Gly Leu Cys Gly Ser

35

40

<210> 6

<211> 53

<212> DNA

<213> primer 1

<400> 6

cacaagcttc cattgtgctg gatgaagata ataattctgt ctgttatatt ggc

53

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> primer 2

<400> 7

tgtggatcct tgacattcag gtggtacttc tag

33

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213>prmer 3

<400> 8

caagcttgcg gccgcaggat ccgtgagcaa gggcgaggag ctgttcac

48

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213>primer 4

<400> 9

taccattgtg ctggatggtg agcaaggcgaggagctg

38

【図面の簡単な説明】

【図1 a】PCR法により増幅したウミボタル発光酵素遺伝子 (V l u c) と変異型黄色蛍光蛋白質遺伝子 (E Y F P) を哺乳類細胞発現用ベクター p E F - B O S に挿入した発光蛍光融合タンパク質ベクターの構築。

【図1 b】哺乳類細胞発現用ベクター p E F - B O S に挿入したウミボタル発光酵素遺伝子 (V l u c) と変異型黄色蛍光蛋白質遺伝子 (E Y F P) の発光蛍光融合タンパク質。

【図2】分泌型発光・蛍光融合タンパク質 (V l u c - E Y F P) を導入した細胞内及び細胞外でのウェスタンブロット解析。

【図3】分泌型 (V l u c - E Y F P)、非分泌型 (R l u c - E Y F P) の発光蛍光融合タンパク質分子プローブを導入した C o s 7 細胞の蛍光画像。

【図4】単独ウミボタル発光酵素 (V l u c) と発光蛍光融合タンパク質 (V l u c - E Y F P) の発光活性の比較。

【図5】発光酵素単独及び発光酵素-蛍光蛋白質融合体の発光スペクトル。エネ

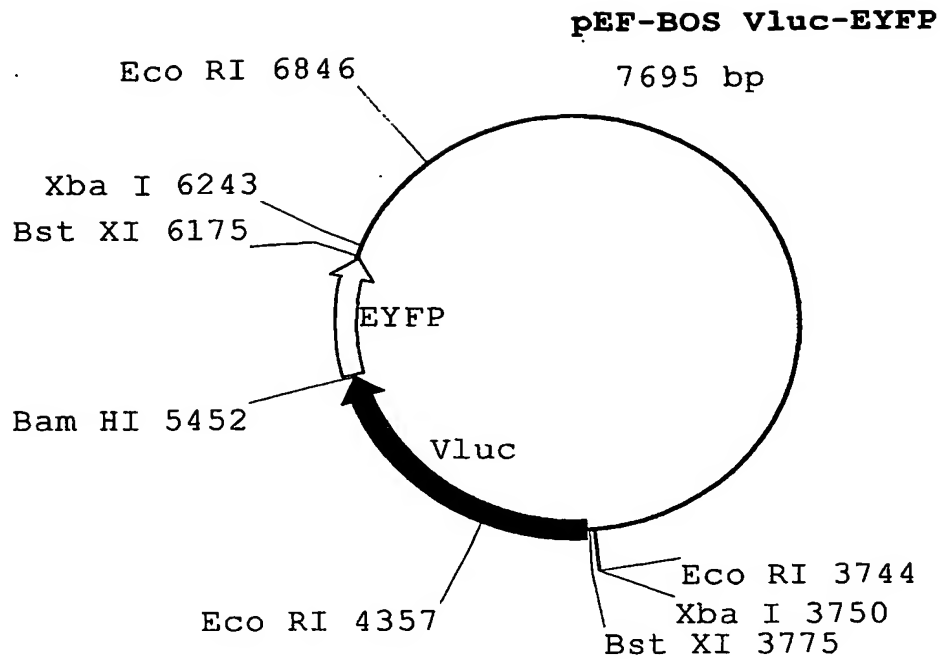
ルギー移動したピークは蛍光蛋白質の蛍光スペクトルと一致した。1) V l u c 単独の発光、2) V l u c - E Y F P の発光、3) E Y F P の発光

【図 6】 発光酵素-蛍光蛋白質融合体に異なるモニターペプチドを挿入したときのエネルギー移動効率の変化（発光スペクトルの変化）を示す。

【図 7】 挿入ペプチド 1, 2 の予想される 2 次構造及び疎水性を示す。

【書類名】 図面

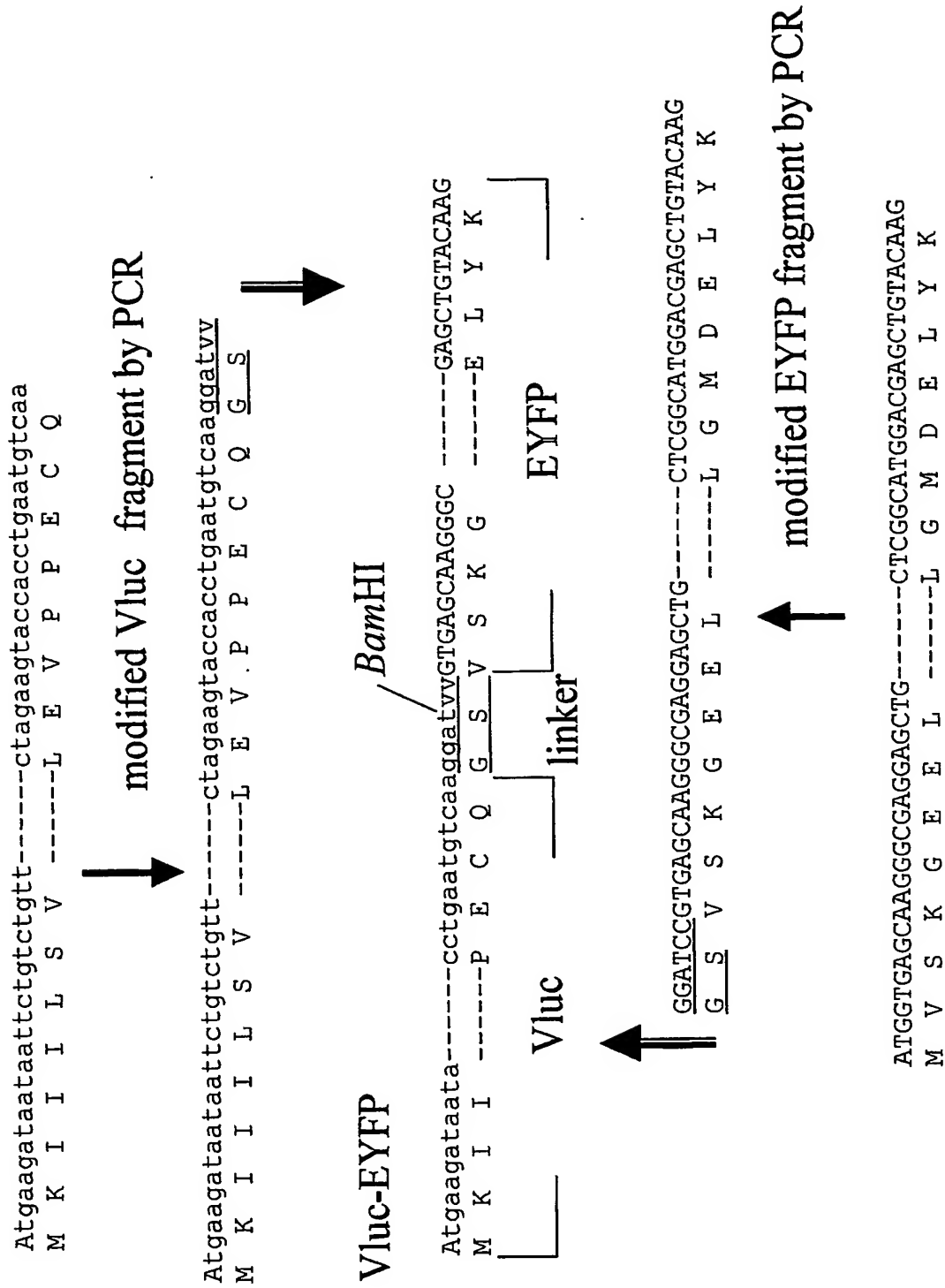
【図 1 a】



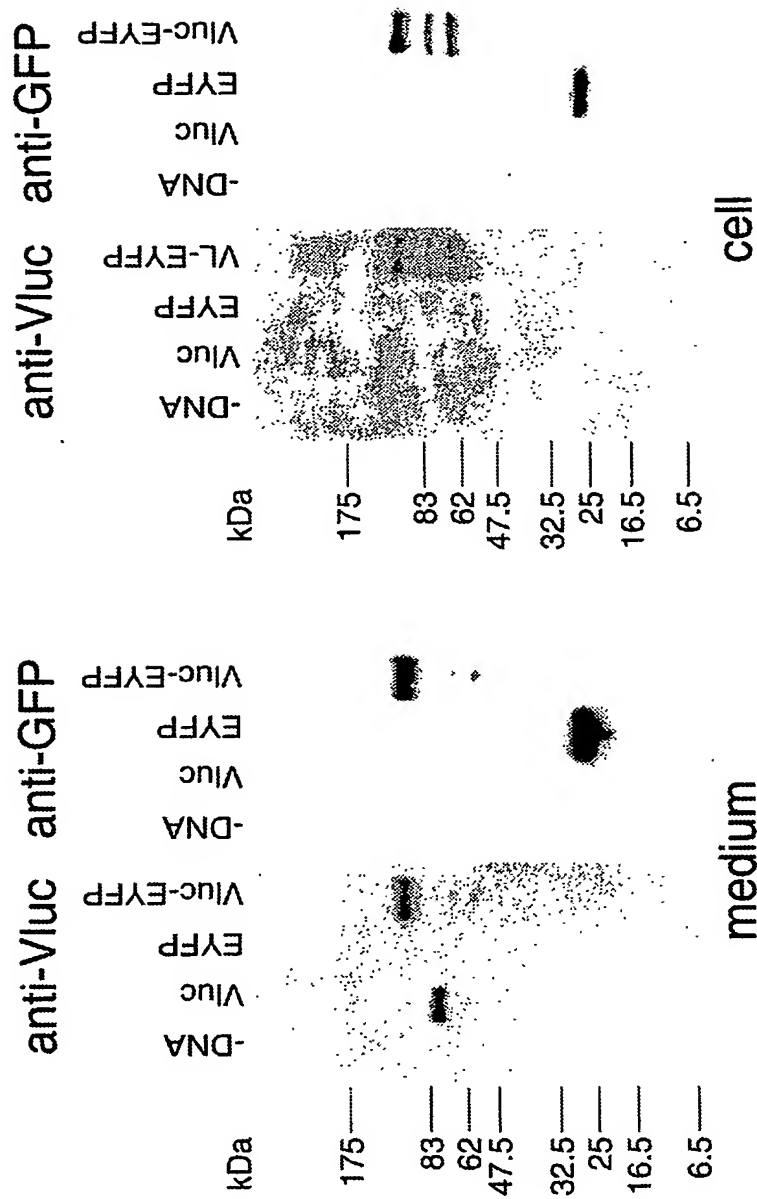
Plasmid name: pEF-BOS Vluc-EYFP

Plasmid size: 7695 bp

【図 1 b】



【図 2】



【図3】

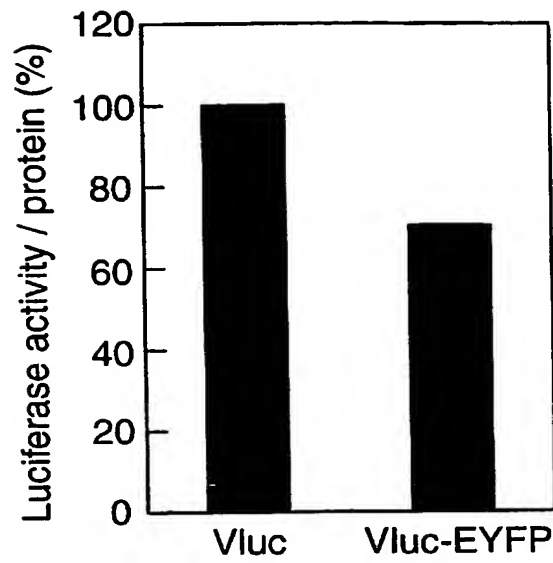
Rluc-EYFP



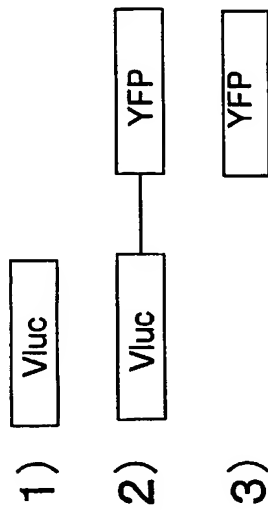
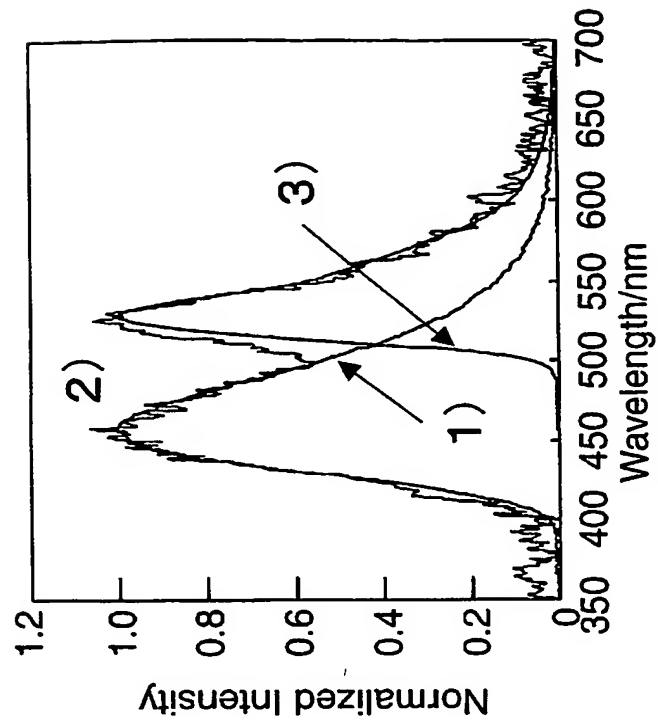
Vluc-EYFP



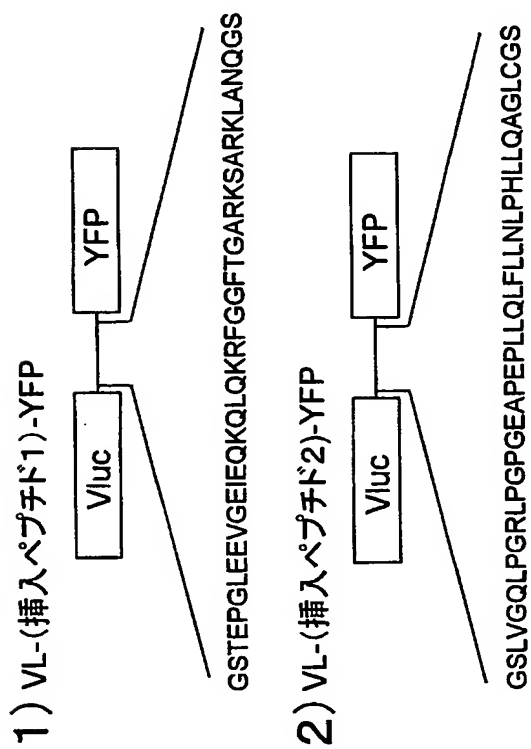
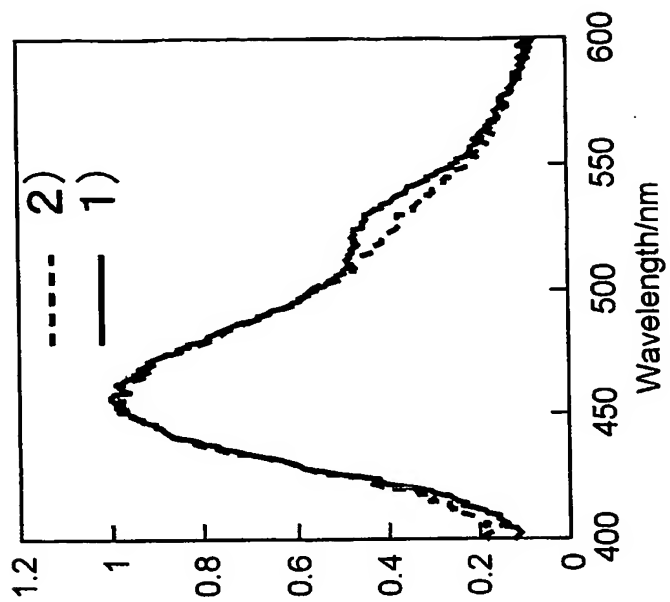
【図 4】



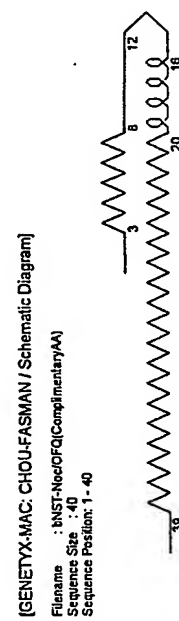
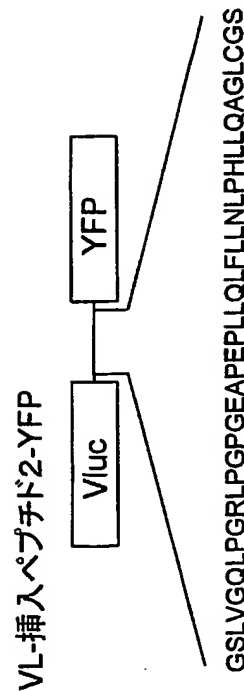
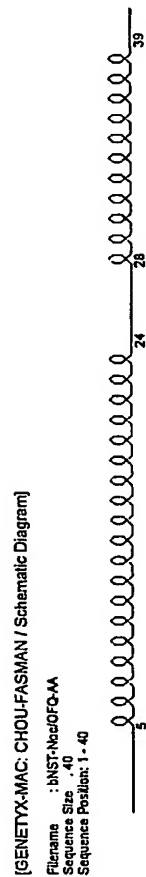
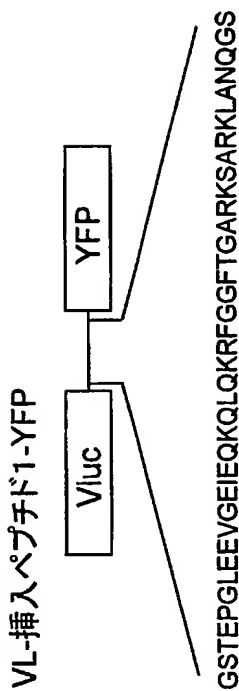
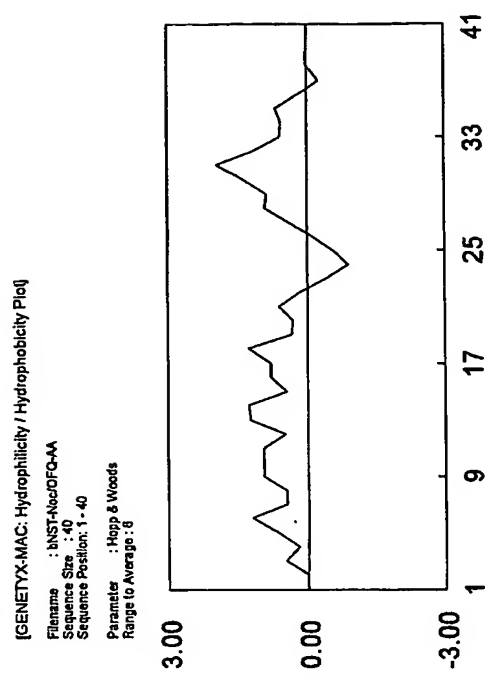
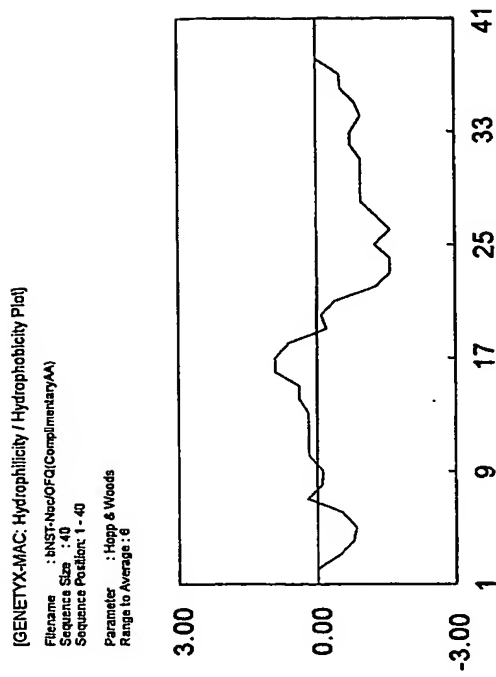
【図 5】



【図6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 発光酵素の放つ発光が蛍光蛋白質を励起し、エネルギー移動により発光色が変化することで、励起光を用いずに蛍光測定可能な融合構築物を作成する。

【解決手段】 分泌型ないし膜結合型生物発光タンパク質のC末端側に蛍光蛋白質を連結した、該発光タンパク質と該蛍光蛋白質の間にエネルギー移動が起こり得る分泌型キメラタンパク質。

【選択図】 なし

特願 2002-261229

出願人履歴情報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

2001年 4月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☒ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**